



TITLE:

局外生規収載生薬類の品質評価に資する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

田中, 誠司

CITATION:

田中, 誠司. 局外生規収載生薬類の品質評価に資する研究. 京都大学, 2020, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22392>

RIGHT:

許諾条件により本文は2021-03-22に公開; 許諾条件により要旨は2020-03-25に公開; "DNA barcoding for identification of agarwood source species using trnL-trnF and matK DNA sequences" Seiji Tanaka, Michiho Ito ("Journal of Natural Medicines" 2020, Volume 74, Issue 1, pp 42-50). doi:10.1007/s11418-019-01338-z. "Species identification of Indonesian agarwood using a DNA-barcoding method" Seiji Tanaka, Michiho Ito ("Journal of Natural Medicines" 2020, Volume 74, Issue 1, pp 323-330). doi:10.1007/s11418-019-01362-z. "Quantitative Analysis of Ent-Kaurane Diterpenoids in Isodon Herb (Enmei-So) by HPLC-UV" Seiji Tanaka, Michiho Ito ("Chemical and Pharmaceutical Bulletin" 2021, Volume 69, Issue 3, pp 246-252). doi:doi.org/10.1248/cpb.c20-00769.

京都大学	博 士（薬科学）	氏 名	田中 誠司
論文題目	局外生規収載生薬類の品質評価に資する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>我が国の医薬品の規格基準書である日本薬局方(日局)において、天然物であり多成分系を有する生薬は化学合成の医薬品とは区別して取り扱われている。生薬の基原は日局で適否の判定基準とされており、原料となる植物や動物等の種の同定は重要な意味をもっている。</p> <p>沈香は<i>Aquilaria</i>属をはじめとした特定のジンチョウゲ科植物の幹や枝の材の黒色の樹脂が沈着した部位を削りだしたものであり、生薬は木材の一部分ではないので、その味、においや色、形による基原鑑別は困難である。他方、沈香の野生品はCITESの附属書Ⅱに列せられるもので利用には国際的規制があり、基原種の鑑別は重要事項となっている。また、沈香は薫香生薬としての利用の注目度も高く、中国・東南アジア地域を中心とした研究者が多くとりあげているが、研究材料の種の同定の確定情報を欠くために成果の科学的検討の裏付けが弱く発展できていない場合も多い。そこで本研究では、沈香のDNAを用いた基原鑑別法構築に着手した。</p> <p>第一章 沈香のDNAを用いた基原鑑別方法の開発</p> <p>薫香生薬として珍重される沈香では、においを特徴づける低分子化合物に関する研究が盛んに行われてきたが、基原の鑑別が困難であった為、科学的検証に至る研究は少ない。また、国際取引の規制面からも正確な基原鑑別技術が求められている。そこで本研究では、沈香に適用できる DNA を用いた基原鑑別法の構築を試みた。使用した試料は日本及び東南アジアに流通する沈香である。PCR 増幅領域として植物の近縁種鑑別に汎用される <i>trnL-trnF</i> 領域と <i>matK</i> 領域を選んだ。また、一部の試料では該当領域の増幅が不十分だった為、nested PCR の手法を用いた。得られた増幅産物を解析し全試料で配列を得たが、既存のデータベースでは沈香の当該配列情報が不足しており、7 種は同定できたがすべてを鑑別することはできなかった。沈香試料は数十年から時には百年以上前に流通していた試料の基原種同定が要求されることもあり、通常の DNA 抽出・増幅方法では配列が得られない場合が多かったが、開発した方法によりこれが可能となった。</p> <p>第二章 インドネシア産沈香基原植物の基原鑑別</p> <p>沈香の主産地はインドシナ半島とインドネシアであるが、インドネシア産沈香、特にその基原に関する情報は少ない。そこでインドネシアにて現地調査を行い、得られた試料を用いてDNAによる基原鑑別を実施した。その結果、<i>Gyrinops</i>属を基原とする沈香が多く試料の中に存在した。日本薬局方外生薬規格(局</p>			

外生規)2018では*Aquilaria*属5種のみを沈香の基原植物としているが、実際に日本で流通している沈香の中には*Gyrinops*属を基原とするものが含まれていることが示された。

生薬の品質評価、また安全性の確保等レギュラトリーサイエンスの観点から必要とされる要素には正しい基原を用いること、また適切な指標成分を用いて含有成分についての確認を行うこと等が挙げられる。局外生規には適切な指標成分が究明されていない生薬が多く収載されており、延命草もそのひとつである。

第三章 延命草に含まれるジテルペン類についての検討

採集品 3 検体、市場品 8 検体の延命草を用いて、ITS 領域を PCR 増幅領域とした基原種鑑別を、また HPLC による主要成分含有量の測定を行った。成分含有量分析に供する試料はそれぞれ葉・茎・花に分別したもの、更にそれらを粉末化処理したもの・粗切状態にしたものを使用した。その結果、基原種は 2 種に鑑別されたが、エンメイ等ジテルペン類の含有量の差異は基原種の違いによるものではなかった。また、部位別では花が最も成分含有量が多く茎が最も少なく、製品に含まれる部位の割合差が生薬試験を行った際の含有成分量に影響を及ぼすと考えられる。粉末化試料では粗切試料よりもジテルペン類の含量が減少しており、延命草含有ジテルペン類化合物が粉末化の際に発生する熱や衝撃に非常に弱いことが示された。安定した成分含量を測定する為には、まず保存や加工の条件の標準化が必要だということが明らかとなった。

以上、申請者は、沈香についてDNAを用いた基原鑑別法を構築し、これまで不可能であった生薬片から基原を同定することを可能にした。この方法を用いて日本に流通する沈香の中に*Gyrinops*属由来のものが既に多くあることを明らかにし、それらは新たな生薬資源となる可能性を示した。また、延命草については、特徴成分であるジテルペン類の含有量が生薬を粉砕する際に大きく減少することを明らかにし、生薬試験法の例外規定を定めることで安定した指標成分として利用できる可能性を示した。本研究の成果は局外生規収載の沈香と延命草をはじめ、同様の問題を含む生薬類のレギュレーションに資する方法の構築と新しい知見を示すものである。

(論文内容の要旨)

我が国の医薬品の規格基準書である日本薬局方(日局)において、天然物であり多成分系を有する生薬は化学合成の医薬品とは区別して取り扱われている。生薬の基原は日局で適否の判定基準とされており、原料となる植物や動物等の種の同定は重要な意味をもっている。

沈香は*Aquilaria*属をはじめとした特定のジンチョウゲ科植物の幹や枝の材の黒色の樹脂が沈着した部位を削りだしたもので、生薬は木材の一部分でしかなく、その味、においや色、形による基原鑑別は困難である。他方、沈香の野生品はCITESの附属書Ⅱに列せられるもので利用には国際的規制があり、基原種の鑑別は重要事項となっている。また、沈香は薫香生薬としての利用の注目度も高く、中国・東南アジア地域を中心とした研究者が多くとりあげているが、研究材料の種の同定の確定情報を欠くために成果の科学的検討の裏付けが弱い場合が多い。そこで本研究では、沈香のDNAを用いた基原鑑別法構築を目標とした。

第一章 沈香のDNAを用いた基原鑑別方法の開発： 薫香生薬として珍重される沈香では、なおいを特徴づける低分子化合物に関する研究が盛んに行われてきたが、基原の鑑別が困難であった為、科学的検証に至る研究は少ない。また、国際取引の規制面からも正確な基原鑑別技術が求められている。そこで、沈香に適用できるDNAを用いた基原鑑別法の構築を試みた。使用した試料は日本及び東南アジアに流通する沈香で、PCR増幅領域として植物の近縁種鑑別に汎用される

第二章 インドネシア産沈香基原植物の基原鑑別： 沈香の主産地はインドシナ半島とインドネシアであるが、インドネシア産沈香、特にその基原に関する情報は少ない。そこでインドネシアにて現地調査を行い、得られた試料を用いてDNAによる基原鑑別を実施した。その結果、*Gyri-nops*属を基原とする沈香が多く試料の中に存在した。日本薬局方外生薬規格(局外生規)2018では*Aquilaria*属5種のみを沈香の基原植物としているが、実際に日本で流通している沈香の中には*Gyrinops*属を基原とするものが含まれていることが示された。

第三章 延命草に含まれるジテルペン類についての検討： 生薬の品質評価、また安全性の確保等レギュラトリーサイエンスの観点から必要とされる要素として、正しい基原を用いること、また適切な指標成分を用いて含有成分についての確認を行うこと等が挙げられる。局外生規には適切な指標成分が究明されていない生薬が多く収載されており、延命草もそのひとつである。採集品3検体、市場品8検体の延命草を用いて、ITS領域をPCR増幅領域とした基原種鑑別を、またHPLCによる主要成分含有量の測定を行った。成分含有量分析に供する試料はそれぞれ葉・茎・花に分別したもの、更にそれらを粉末化処理したもの・粗切状態にしたものを使用した。その結果、基原種は2種に鑑別されたが、エンメイン等ジテルペン類の含有量の差異は基原種の違いによるものではなかった。また、部位別では花が最も成分含有量が多く茎が最も少なく、製品に含まれる部位の割合差が生薬試験を行った際の含有成分量に影響を及ぼすと考えられた。粉末化試料では粗切試料よりもジテルペン類の含量が減少しており、延命草含有ジテルペン類化合物が粉末化の際に発生する熱や衝撃に弱いと推定される。安定した成分含量を測定する為、保存や加工の条件の標準化の必要性を明らかにした。

以上のように、本研究の成果は局外生規収載の沈香と延命草をはじめ、同様の問題を含む生薬類のレギュレーションに資する方法の構築と新しい知見を示すものである。

よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年2月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。